

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07H 1/06, 21/00, C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/49714 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. Dezember 1997 (31.12.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/01332 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Juni 1997 (24.06.97) (30) Prioritätsdaten: 196 25 397.7 25. Juni 1996 (25.06.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEILER, Jan [DE/DE]; Johannes-Brahms-Strasse 22, D-69181 St. Ilgen (DE). HOHEISEL, Jörg [DE/DE]; Richard-Wagner-Strasse 2, D- 69168 Wiesloch (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR COMBINING PARALLEL OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS AND PREPARATION OF OLIGOMER CHIPS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KOMBINATION VON PARALLELER OLIGONUKLEOTIDSYNTHESE UND DARSTELLUNG VON OLIGOMER-CHIPS (57) Abstract <p>The invention concerns a process for the parallel synthesis of oligonucleotides on an alkylamino-modified matrix surface, characterised in that 3-succinate derivatives of protected nucleosides are applied thereto and oligonucleotide synthesis takes place by means of automated DNA synthesis. The invention also concerns the use of the oligomer chip formed in the process.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur parallelen Synthese von Oligonukleotiden auf einer Alkylamino-modifizierten Matrixoberfläche, dadurch gekennzeichnet, daß 3-Succinat-Derivate von geschützten Nukleosiden darauf angebracht werden und Oligonukleotidsynthese mittels automatisierter DNA-Synthese stattfindet. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung des bei dem Verfahren entstehenden Oligomer-Chips.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

"Verfahren zur Kombination von paralleler Oligonukleotidsynthese und Darstellung von Oligomer-Chips"

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kombination von paralleler Oligonukleotidsynthese und Darstellung von Oligomer-Chips.

5 Angeregt durch die Kombination von Festphasentechnologie und der Phosphoramiditchemie, gab es große Fortschritte in der Automation der DNA-Synthese. Heute findet die Herstellung synthetischer Oligonukleotide, die für biologische, biomedizinische und physikalische Anwendungen gebraucht werden, in automatisierten DNA-Synthesegeräten statt. Diese Geräte produzieren Oligonukleotide im Nano- bis Mikromol-Bereich. Jedoch gab es in den letzten Jahren zwei gegenläufige Tendenzen bezüglich der Oligomersynthese. Für klinische Anwendungen, wie z.B. für die Antisense-Strategie, sind Gramm- oder sogar Kilogramm-Mengen an Oligonukleotiden erforderlich, was eine Erhöhung des Maßstabs bei der Oligomersynthese notwendig macht. Dagegen sind für Anwendungen in der Molekularbiologie, z.B. bei der Polymerasekettenreaktion oder beim Sequenzieren von DNA, nur Oligomermengen im Picomolbereich erforderlich. Allerdings werden für diese Anwendungen eine Anzahl unterschiedlicher Oligonukleotide benötigt. Dies hat das Problem aufgeworfen, gleichzeitig verschiedene Oligomere in kleinen Mengen produzieren zu müssen. Andererseits spielt in der Molekularbiologie die sogenannte "Oligomer-Chip Technologie" eine zunehmende Rolle in der diagnostischen DNA-Analyse. Auch bezüglich vieler Methoden der Genomanalyse, z.B. für das "Sequenzieren durch Hybridisieren", steckt ein großes Potential in der Verwendung von Matrizen, auf die geordnete Oligonukleotid-Raster aufgebracht wurden.

20

25 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem es möglich ist, auf einfache Weise möglichst verschiedene Oligonukleotide bereitzustellen, die einerseits als "Oligomer-Chips" für Hybridisierungsexperimente dienen können, andererseits aber auch geordnet ablösbar und somit verfügbar für molekularbiologische Reaktionen wie PCR oder

DNA-Sequenzierung sind.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gemäß Patentanspruch 1. Bevorzugte Ausführungsformen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

5

Die Erfinder sind bei der Entwicklung ihres neuen Verfahrens von der "Oligomerchip-Technologie" (Southern, E.M. et al., Genomics 13, 1008-1017; Caviani-Pease, A.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 5022-5026) ausgegangen, die bisher für die Sequenzierung von DNA eingesetzt wurde. Bei dieser Technik wird eine Matrix mit kurzen daran gebundenen Oligonukleotidsequenzen als Ziel für Hybridisierungsexperimente eingesetzt. Dabei wird darauf geachtet, daß die an die Matrix gebundenen Oligonukleotide fest damit verbunden sind.

10

15

Von den Erfindern wurde nun diese Bindung der Oligonukleotide an die Matrix so modifiziert, daß es einerseits möglich ist, den entstehenden Oligomerchip zu Hybridisierungsanalysen von DNA mittels Oligomerchip-Technologie einzusetzen oder die Oligonukleotide geordnet abzulösen, um sie dann für PCR-Zwecke oder bei der enzymatischen Sequenzierung von DNA bzw. als Sonde für Hybridisierungen einzusetzen.

20

Als Matrix, auf der die Oligonukleotide gebunden werden, kann eine Polymerfolie oder eine Glasoberfläche eingesetzt werden, bevorzugt ist jedoch eine aminierte Polypropylenfolie, die weiter oberflächenmodifiziert wird. Eine mögliche Oberflächenmodifizierung ist die Anbringung von Alkylamino-Gruppen, bevorzugt Methylamino-Gruppen. Dies geschieht beispielsweise dadurch, daß eine aminierte Polypropylenfolie in einem Gemisch von trockenem Dichlormethan, trockenem Dioxan, p-Nitrophenylchlorformiat und Triethylamin für einige Stunden geschüttelt wird. Nach Waschen mit Dichlormethan, wird die Folie in einem Gemisch von Pyridin und Acetanhydrid für einige Stunden geschüttelt, wodurch verbliebene Aminogruppen auf der Oberfläche abgesättigt werden. Nachfolgend wird die Folie mit Dichlormethan gewaschen und in Acetonitril oder Dimethylformamid aufgenommen. Es wird 1,6-Bis(methylamino)-hexan zugesetzt und das

25

30

- 3 -

Gemisch für einige Stunden bis mehrere Tage geschüttelt. Nach Waschen mit DMF, Methanol und Aceton, wird die Methylamino-modifizierte Membran getrocknet.

5 Eine vorstehende Matrix, insbesondere eine Methylamino-modifizierte Membran, kann in eine Synthesekammer, z.B. eine wie in Abb. 1 gezeigt, eingespannt werden. Auf die Matrix können 3'-Succinatderivate von geschützten Nukleosiden (dA^{NPEOC} , dC^{NPEOC} , $\text{dG}^{\text{NPEOC/NPE}}$, dT und Fluorescein-markiertes dC) aufgebracht werden, wobei die 3'-Succinatderivate wie in Kierzek et al. (Biochemistry 25, S. 7840-7846 (1986)) beschrieben, hergestellt werden können. Für das Aufbringen
10 werden gewünschte Nukleosid-3'-Succinate mit einem organischen Lösungsmittel, z.B. N-Methylmorpholin und Acetonitril, gemischt, bevor O-[(Ethoxycarbonyl)cyanomethylenamino]N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TOTU) zugesetzt wird. Dieses Reaktionsgemisch wird in die Synthesekammer gespeist und ein einfacher voreingegebener Zyklus in der Kammer aktiviert. Dieser Zyklus
15 sieht beispielsweise so aus, daß die Reihen auf der Matrix, vorzugsweise der Methylamino-modifizierten Polypropylenfolie, mit dem Reaktionsgemisch befeuchtet werden und für eine bestimmte Zeit, z.B. 30 Minuten, inkubiert werden. Dann werden die Reagentien abgespült und die Reihen einige Male mit
20 einem organischen Lösungsmittel, wie Acetonitril, gewaschen. Zum Blockieren der restlichen Methylaminogruppen auf der Matrix wird diese mit einem Gemisch von Pyridin und Acetanhydrid für mehrere Stunden behandelt. Alternativ kann die aus der Synthesekammer entfernte Matrix in einem Gemisch von Acetanhydrid, Pyridin und N-Methylimidazol behandelt werden. Nach Waschen mit DMF,
25 Methanol und Aceton wird die Matrix getrocknet.

Für die Oligonukleotidsynthese kann es günstig sein, nachstehendes Schema zu verwenden. Zur Durchführung eignet sich z.B. die in Fig. 1 gezeigte Synthesekammer. Modifikationen des Schemas hinsichtlich Abfolge der Schritte, Austausch der Reagentien bzw. Lösungsmittel und Inkubationszeiten liegen im
30 Können des Fachmanns und das Schema soll für die Erfindung in keinsten Weise beschränkend ausgelegt werden.

TABELLE 1

Schema einer Oligonukleotidsynthese

	<u>Schritt</u>	<u>Reagenz oder Lösungsmittel</u>	<u>Zeit (s)</u>
5	Waschen	Acetonitril	30
10	Detritylierung	3 % TCA in Dichlormethan	80
15	Waschen	Acetonitril	210
20	Koppeln	75 mM Phosphoramidit + 0,5 M Tetrazol in Acetonitril	40
25	Waschen	Acetonitril	30
30	Ablösen	Acetanhydrid/N-Methylimidazol in Acetonitril	50
35	Oxidation	1 M t-Butylhydroperoxid in Acetonitril	130
40	Waschen	Acetonitril	120
45	Nach vollständiger Synthese wird die Matrix aus der Synthesekammer entfernt und in 1 M 1,8-Diazabicyclo-(5.4.0)-undec-7en (DBU) in Acetonitril zur De- protektion der Oligonukleotide geschüttelt. Vor dem Einsatz in Hybridisierungsexperimenten oder dem Ablösen der Oligomere wird die Matrix gewaschen, z.B. mit Acetonitril und Aceton.		
50	Zum Ablösen der einzelnen Oligonukleotide wird die gewünschte Fläche des entstandenen Oligomerschips ausgeschnitten und nach einer Inkubation in 30% wässrigem Ammoniak für einige Stunden, z.B. 2 Stunden, werden die abgelö-		

sten Oligonukleotidprodukte lyophilisiert und für die PCR oder DNA-Sequenzierungsmethoden genutzt.

Bei der vorstehend beschriebenen NPE/NPEOC-Strategie werden die β -eliminiere-
5 rende Basenschutzgruppen 2-Nitrophenylethyl (NPE) und 2-(4-Nitrophenyl)-ethoxycarbonyl (NPEOC) verwendet. Diese Funktionen erlauben die Deprotektion des Biopolymers durch die starke, aber nicht-nukleophile Base DBU, während die Oligonukleotide auf der Matrix gebunden bleiben.

10 Die vorliegende Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die folgenden Abbildungen beschrieben:

Abb. 1: Reaktionskammer für die Oligonukleotidsynthese auf Polypropylen-
15 folie, wobei das Gerät so ausgerichtet ist, daß es eine 90° Rotation der Polypropylenfolie zwischen den Syntheseschritten erlaubt.

Abb. 2: Anbringung einer Probe und Ablösung durch Ammoniak (NH_4OH),
20 verwendet für die Standardsynthese freier Oligonukleotide (a) und für die Herstellung von Oligonukleotid-Anordnungen (b); $X = \text{O}$; $X = \text{NH}$

Abb. 3: Abtrennung der Festphasen-gebundenen Oligonukleotide von der
25 Oberfläche. Anwendung der "NPE/NPEOC-Strategie" erlaubt die alternative Verwendung der Oligomerchips für entweder Hybridisierungsexperimente (Option I) oder als Quelle für die Isolation einzelner Primermoleküle (Option II).

Abb. 4: Aktivierung der Methylamino-modifizierten Polypropylenfolie und
30 Kopplung der geeignet geschützten Nukleoside.

Abb. 5: Exemplarische Hybridisierungen zu Oligomeranordnungen auf Polypropylenmembranen.

- 6 -

(a), (b): 4 verschiedene Startnukleoside, dC^{NPEOC} (Säulen 3,7), dA^{NPEOC} (Säulen 2,6), dC^{bz} (Säule 1) und dC^H (Säulen 4,8) wurden an eine Polypropylenfolie unter Verwendung eines 8-Kanal-Syntheseegeräts aufgebracht. Die Folie wurde dann aus der Reaktionskammer entfernt und um 90° gedreht. Nachfolgend wurden 7 verschiedene Oligonukleotide synthetisiert (A-H), die 49 Plätze mit 28 verschiedenen Sequenzen erzeugen. Ein Kanal wurde in beiden Dimensionen als Kontrolle leer gelassen (Spuren 5 und D). Nach Oligomerdeprotektion wurden einige Plätze (z.B. B2,6,8; C8; E8) zur Analyse ausgeschnitten. Die verbleibende Folie wurde mit einem (a) 9-mer d(CTATAGTGA) und (b) einem 12-mer d(GA₁₁) hybridisiert. Komplementäre Sequenzen sind unterstrichen. In (c) und (d) wurde die Folie zwischen den Syntheseschritten um 90° gedreht. Es wurden Nonamere hybridisiert, deren Sequenzen Bruchpunkte der Synthese abdecken.

Abb. 6: PCR-Amplifikation eines Plasmid-Inserts. Beide kommerziellen Primer wurden für die Reaktion verwendet, die in Spur 1 aufgetragen ist. In den Spuren B und C wurde jeder der Primer durch Oligonukleotide ersetzt, die von einem $0,16 \text{ cm}^2$ Stück der erfindungsgemäß behandelten Polypropylenfolie isoliert worden sind. Marker (Spur D) ist HindIII-verdaute λ -DNA und mit FspI geschnittene Plasmid pUC18-DNA.

BEISPIEL

Ein Polyoxymethylen (POM)-Block wurde so hergestellt, daß er 8 Kanäle von jeweils 1 mm Tiefe, 70 mm Länge und 4 mm Breite mit 2 Löchern an beiden Enden für den Anschluß an den Einlaß und Auslaß eines üblichen DNA-Synthesegeräts enthält. Der Polypropylenfilm wurde durch eine Silikonabdichtung und einen Plexiglasdeckel, der auf die POM-Basis geschraubt ist, an Ort und Stelle gehalten (Fig. 1). Um eine perfekte Abdichtung zu erhalten, wurde auf das

- 7 -

gesamte Gerät mittels einer Klammer zusätzlicher Druck angewendet. Durch Entfernen der Polypropylenfolie nach einem einzelnen oder mehreren Zyklen, Rotation um 90° und fortgesetzte Synthese erlaubt dieses einfache und kleine Instrument die Synthese von bis zu 64 verschiedenen Oligomeren. Eine aminierte Polypropylenfolie (8 x 8 cm²) wurde in einem Gemisch von 25 ml trockenem Dichlormethan, 25 ml trockenem Dioxan, 0,2 g p-Nitrophenylchlorformiat und 160 µl Triethylamin für 2 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Nach Waschen mit Dichlormethan wurde die Folie in einem 1:1-Gemisch von Pyridin und Essigsäureanhydrid für 2 h geschüttelt, wodurch die auf der Oberfläche verbliebenen Aminogruppen abgesättigt wurden. Nachfolgend wurde die Folie mit Dichlormethan gewaschen und in 50 ml Acetonitril oder Dimethylformamid (DMF) aufgenommen; es wurden 0,2 ml 1,6-Bis-(methylamino)-hexan hinzugefügt und das Gemisch wurde bei 40°C für 48 h geschüttelt. Nach aufeinanderfolgendem Waschen mit DMF, Methanol und Aceton wurde die Methylamino-modifizierte Propylenfolie getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

3'-Succinatderivate von geschützten Nukleosiden (dA^{NPEOC}, dC^{NPEOC}, dG^{NPEOC/NPE}, dT und Fluorescein-markiertes dC (= dC^{fl}) wurden durch das von Kierzek et al. (Biochemistry 25, Seiten 7840-7846 (1986)) beschriebene Verfahren hergestellt und auf einer Methylamino-modifizierten Polypropylenfolie, nach Befestigen der Folie in dem Polyoxymethylen-Block, aufgebracht. Dazu wurden 5 mg des gewünschten Nukleosid-3'-Succinats mit 25 µl N-Methylmorpholin und 10 ml Acetonitril vor Zugabe von 4 mg TOTU gemischt. Die Flasche mit dem Gemisch wurde sofort mit einem DNA-Synthesegerät verbunden und ein einfacher vorprogrammierter Zyklus in dem Gerät wurde aktiviert: zuerst wurden die Reihen mit dem Reaktionsgemisch benetzt und die Reaktion wurde 30 min inkubiert; dann wurden die Reagenzien mit Argon fortgespült und die Reihen wurden einige Male mit Acetonitril gewaschen. Um restliche Methylamino-Gruppen auf der Polypropylenfolie zu blockieren, wurde Essigsäureanhydrid und N-Methylimidazol in Acetonitril aufgebracht. Alternativ wurden die derivatisierten Polypropylenmembranen aus der Kammer entfernt und in einem Gemisch von 10 ml Essigsäureanhydrid, 10 ml trockenem Pyridin und 1 ml N-Methylimidazol für 2 h in

- 8 -

einer Polypropylenbox geschüttelt. Nach nachfolgendem Waschen mit DMF, Methanol und Aceton wurden die Folien getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

5 Die Oligonukleotidsynthese wurde auf der Polypropylenfolie wie in der vorstehenden Tabelle 1 ersichtlich ausgeführt. Nach kompletter Synthese wurden die Folien aus der Kammer entfernt und in 1 M-DBU in Acetonitril in einer Polypropylenbox bei 40°C über Nacht geschüttelt. Die Membran wurde mit Acetonitril und Aceton gewaschen, bevor sie entweder für Hybridisierungsexperimente oder
10 zum Ablösen der Oligomere eingesetzt wurde.

Oligonukleotidsonden wurden mit [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP unter Standardbedingungen endmarkiert. Die Oligomeranordnungen wurden in 600 mM NaCl, 60 mM Natriumcitrat, pH 7,5, 7,2% Natrium-N-Lauroylsacrosin für 1 h prähybridisiert und dann
15 in 10 ml der selben Lösung, die ungefähr 1 Mcpm radioaktiv markierte Oligomer-sonde (Konzentration = 6 picomol/ml) enthielt, für 18 h bei 4°C inkubiert. Nach 30minütigem Waschen bei 4°C wurde eine Autoradiographie bei -70°C durchgeführt. Die Sonden wurden von den Folien durch Inkubation in Hybridisierungspuffer bei 65°C für 3 h abgelöst. Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in
20 Abb. 5, insbesondere den Abb. 5A und 5B, gezeigt.

Zum Ablösen der einzelnen Oligonukleotide wurden die gewünschten Plätze der Oligomeranordnung auf der Polypropylenfolie ausgeschnitten. Nach Inkubation in 30% wäßrigem Ammoniak für 2 h wurden die abgelösten Oligonukleotid-
25 produkte lyophilisiert und für die PCR und DNA-Sequenzierungsexperimente ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Um die Eignung der Oligomere für die PCR zu testen, wurde eine PCR bei dem rekombinanten Plasmid pTZ18R unter Standardbedingungen, wie bereits früher beschrieben (Scholler et al., Nucleic Acids Res. 23, Seiten 3842-3849, (1995))
30 durchgeführt. Primer waren 26- und 29-Mere, die an den Vektor direkt neben jeder Seite der Insert-DNA binden. Eine Oligonukleotidmenge, die einer Fläche

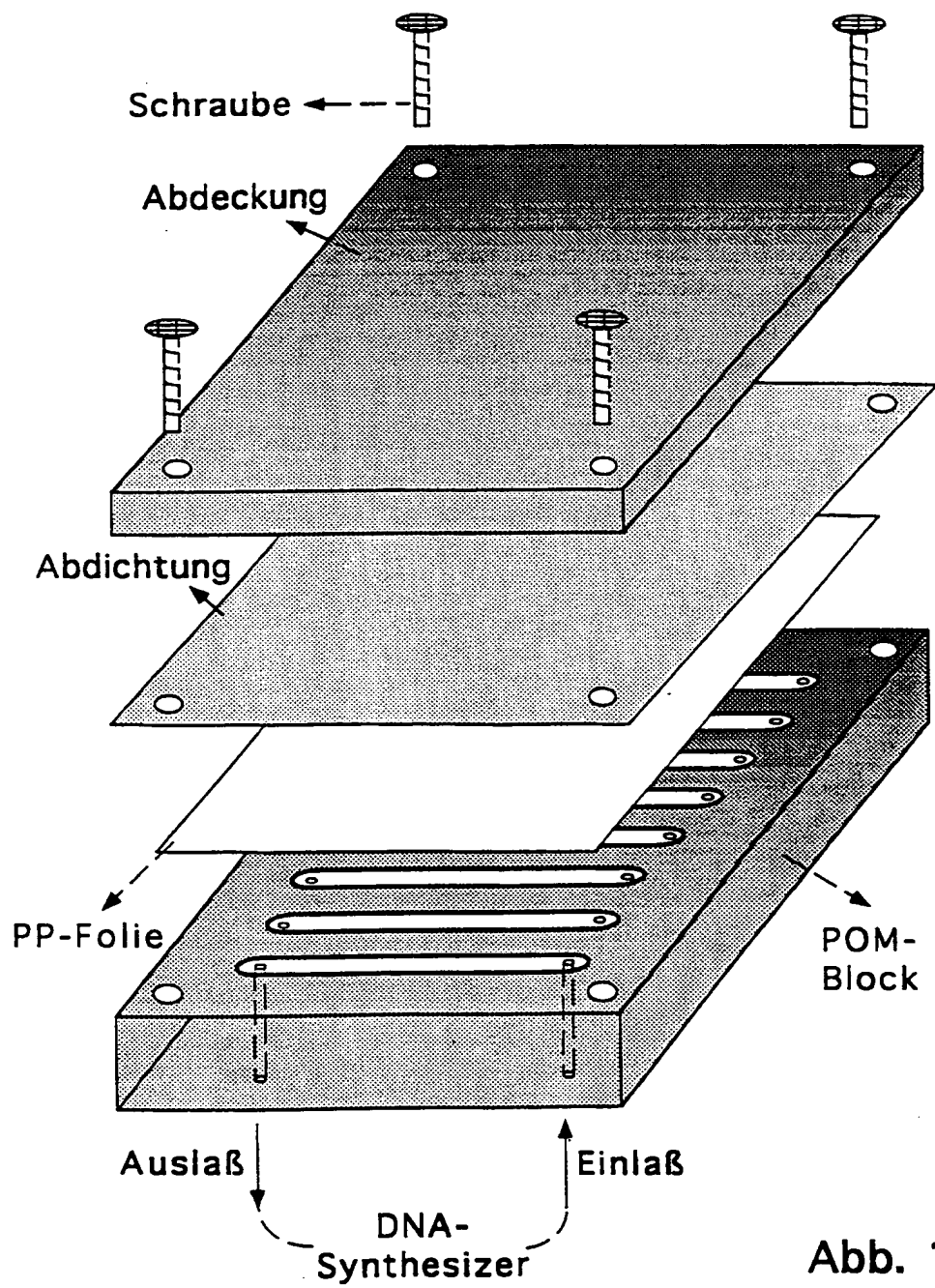
von 0,16 cm² der Polypropylenoberfläche entsprach, wurde in den Reaktionen mit 25 µl Volumen verwendet. Eine PCR wurde ausgeführt: Primer-Annealing und Extension bei 68°C, Strangdenaturierung bei 95°C. Auf einem Agarosegel wurden die Produkte mit den Ergebnissen verglichen, die mit üblichen kommerziellen Primermolekülen erhalten wurden, die in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt worden waren. Wie aus Abb. 6 ersichtlich, ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich Qualität und Quantität der PCR-Produkte.

Auch die Verwendung in einer enzymatischen Sequenzierungsreaktion zeigte, daß die erfindungsgemäß erhaltenen und abgelösten Oligomere gegenüber käuflichen keine signifikanten Qualitätsunterschiede zeigen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur parallelen Synthese von Oligonukleotiden auf einer Alkylamino-modifizierten Matrixoberfläche, dadurch gekennzeichnet, daß 3-Succinat-Derivate von geschützten Nukleosiden darauf angebracht werden und Oligonukleotidsynthese mittels automatisierter DNA-Synthese stattfindet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Matrixoberfläche mit Methylamino-Gruppen modifiziert ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die 3'-Succinat-Derivate von dA^{NPEOC} , dC^{NPEOC} , $dG^{NPEOC/NPE}$, dT und Fluorescein-markiertem dC sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Matrix in einer Synthesekammer mit mehreren Kanälen eingespannt ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Matrix aus Glas oder einem Polymer, bevorzugt Polypropylen, ist.
6. Verwendung des bei dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 entstehenden Oligomer-Chips in Hybridisierungsexperimente oder als Quelle hochqualitativer Biopolymere.

1/9



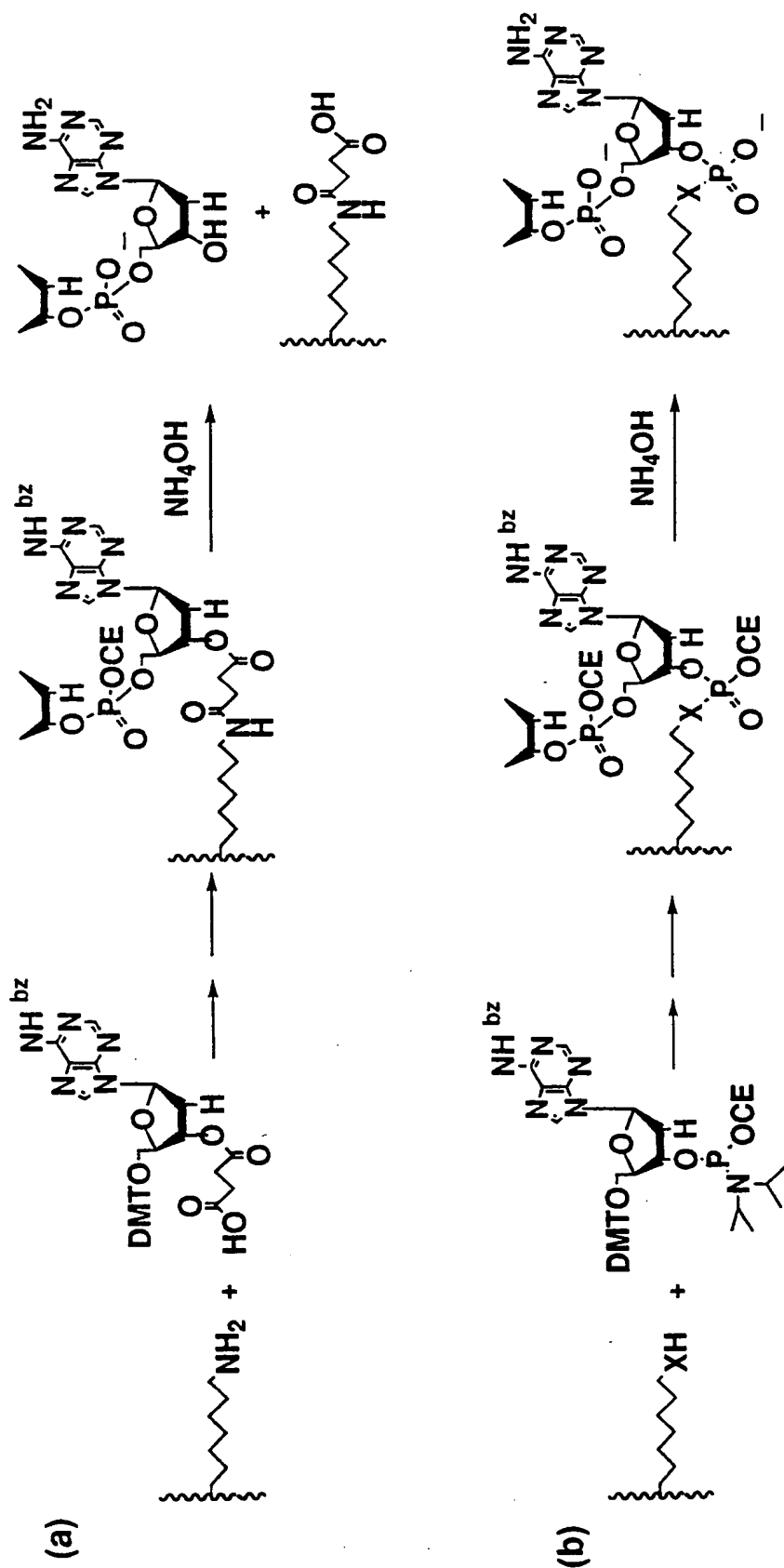
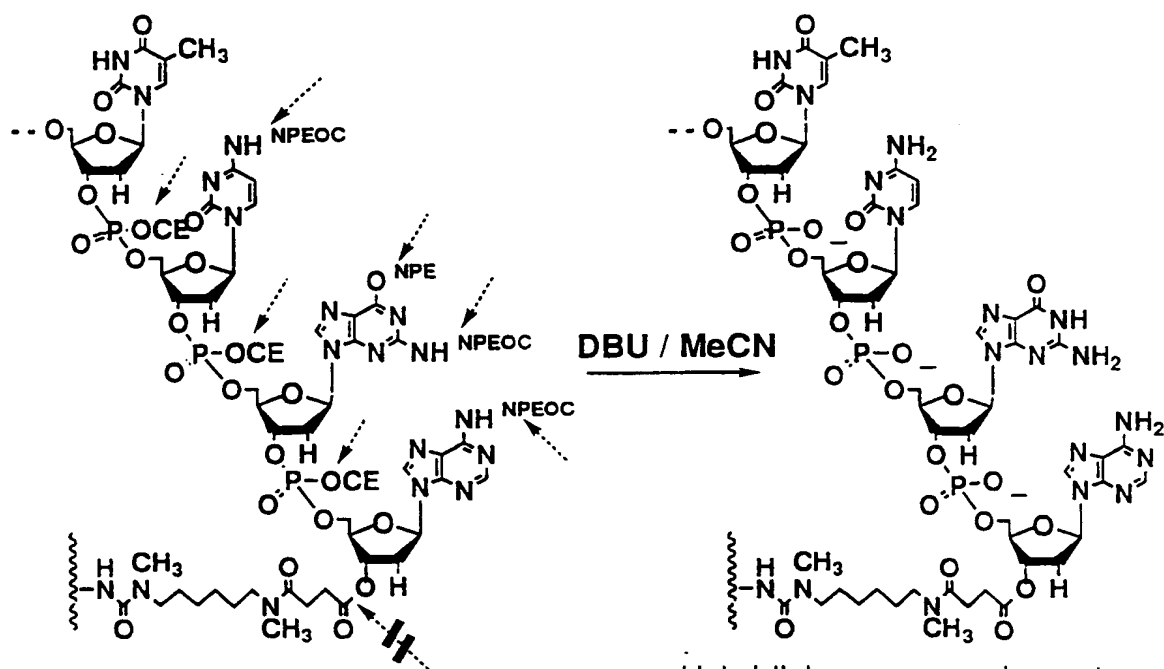


Abb. 2

3/9



Option I: Hybridisierungsexperimente
auf Oligonukleotidanordnungen

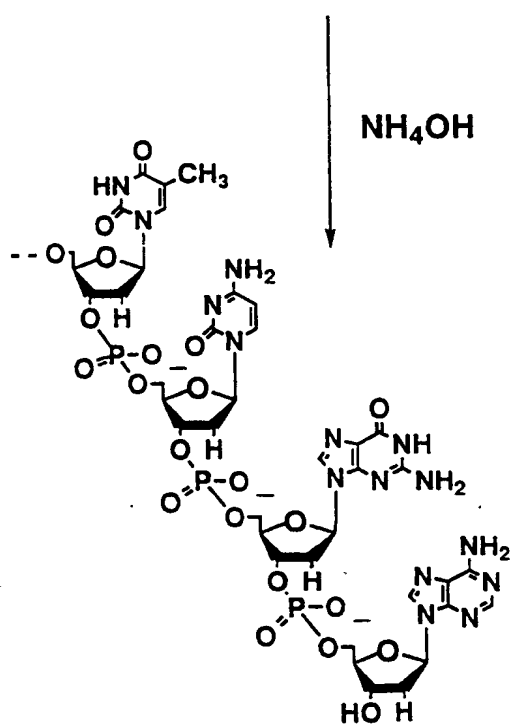
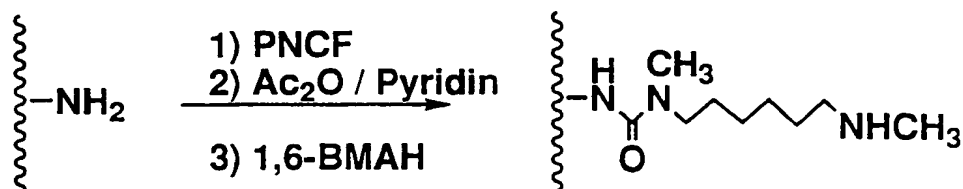


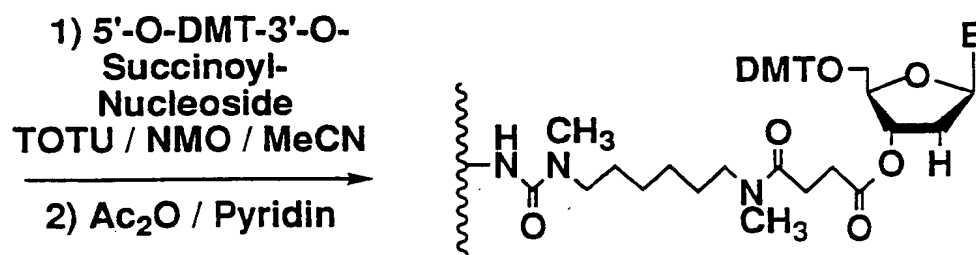
Abb. 3

Option II: Ablösen von DNA-Primern für PCR oder Sequenzierung

4/9



PNCF = p-Nitrophenylchloroformiat
 1,6-BMAH = 1,6-Bis-(methyldamino)-hexan

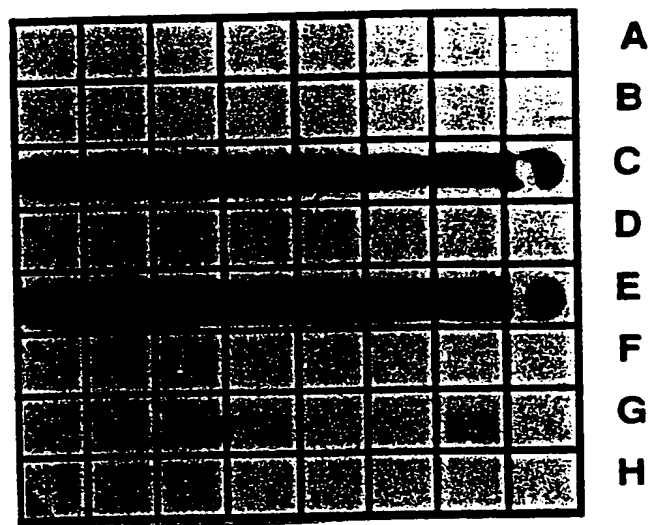


NMO = n-Methylmorpholin

B = dA^{NPEOC}, dG^{NPE/NPEOC}, dC^{NPEOC}, dT, dC^{flu}

Abb. 4

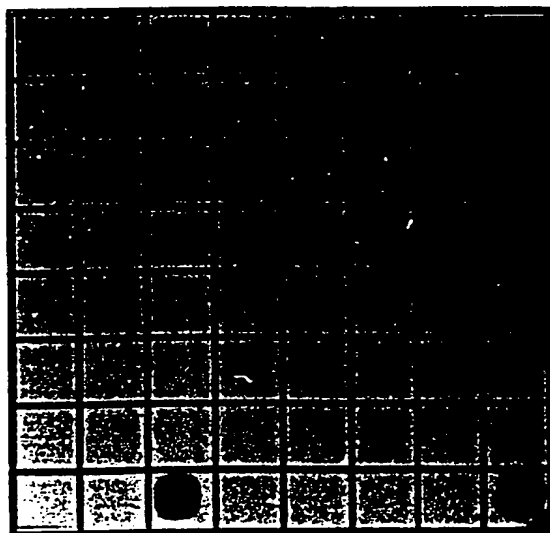
(b) 5'-GAAAAAAAAAAA-3'



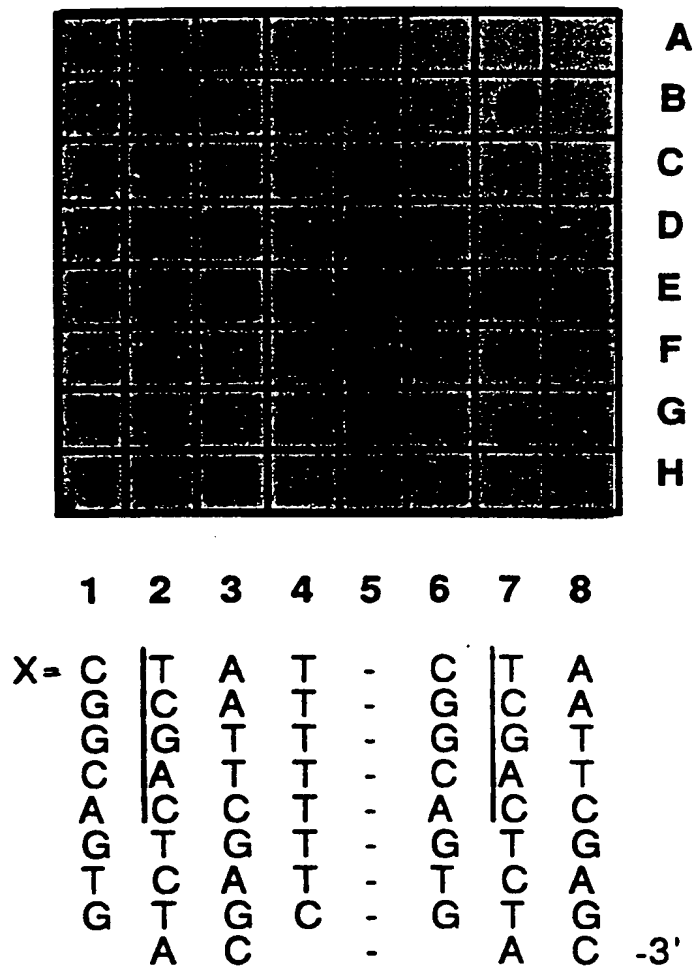
1 2 3 4 5 6 7 8
 X= Cbz A C Cfl - A C Cfl -3'

ABB. 5b

(c) 5'-GCCGTCGTT-3'



(d) 5'-GTCGACCTG-3'



9/9



ABB. 6

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07H1/06 C07H21/00 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07H C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 090 789 A (MONSANTO CO) 5. Oktober 1983 siehe Seite 9, Zeile 13 - Zeile 23 siehe Beispiele 3-5,11 ---	1,3,5
X	FR 2 529 892 A (TRANSGENE S.A.) 13. Januar 1984 siehe Seite 5 siehe Seite 8 --- -/--	1,2,5

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. November 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24. 11. 1997 20. 11. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scott, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	S.IWAI ET AL.: "A NEW SOLID-PHASE SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES BY THE PHOSPHORO-P-ANISIDATE METHOD USING TETRAHYDROFURANYL PROTECTION OF 2'-HYDROXYL GROUPS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., Bd. 15, Nr. 9, 11.Mai 1987, OXFORD GB, Seiten 3761-3772, XP002047319 siehe Abbildung 2	1
A	--- PEASE A C ET AL: "LIGHT-GENERATED OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS FOR RAPID DNA SEQUENCE ANALYSIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 91, Nr. 11, 24.Mai 1994, Seiten 5022-5026, XP000569532 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung	1
A	--- KIERZEK R ET AL: "POLYMER-SUPPORTED RNA SYNTHESIS AND ITS APPLICATION TO TEST THE NEAREST-NEIGHBOR MODEL FOR DUPLEX STABILITY" BIOCHEMISTRY, Bd. 25, Nr. 24, 2.Dezember 1986, Seiten 7840-7846, XP000673484 in der Anmeldung erwähnt siehe Abbildung 1	1
A	--- WO 93 16118 A (CARLSBERG AS) 19.August 1993 siehe Zusammenfassung -----	1

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/01332

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0090789 A	05-10-83	JP 58180500 A	21-10-83
FR 2529892 A	13-01-84	KEINE	
WO 9316118 A	19-08-93	AT 152143 T	15-05-97
		AU 3493493 A	03-09-93
		CA 2129442 A	14-08-93
		DE 69310148 D	28-05-97
		DE 69310148 T	31-07-97
		EP 0625996 A	30-11-94
		ES 2101300 T	01-07-97
		JP 7503744 T	20-04-95
		US 5352756 A	04-10-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/01332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H1/06 C07H21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 090 789 A (MONSANTO CO) 5 October 1983 see page 9, line 13 - line 23 see examples 3-5,11 ---	1,3,5
X	FR 2 529 892 A (TRANSGENE S.A.) 13 January 1984 see page 5 see page 8 --- -/--	1,2,5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 November 1997

Date of mailing of the international search report

24. 11. 1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S.IWAI ET AL.: "A NEW SOLID-PHASE SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES BY THE PHOSPHORO-P-ANISIDATE METHOD USING TETRAHYDROFURANYL PROTECTION OF 2'-HYDROXYL GROUPS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH., vol. 15, no. 9, 11 May 1987, OXFORD GB, pages 3761-3772, XP002047319 see figure 2	1
A	--- PEASE A C ET AL: "LIGHT-GENERATED OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS FOR RAPID DNA SEQUENCE ANALYSIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, no. 11, 24 May 1994, pages 5022-5026, XP000569532 cited in the application see abstract	1
A	--- KIERZEK R ET AL: "POLYMER-SUPPORTED RNA SYNTHESIS AND ITS APPLICATION TO TEST THE NEAREST-NEIGHBOR MODEL FOR DUPLEX STABILITY" BIOCHEMISTRY, vol. 25, no. 24, 2 December 1986, pages 7840-7846, XP000673484 cited in the application see figure 1	1
A	--- WO 93 16118 A (CARLSBERG AS) 19 August 1993 see abstract -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/01332

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0090789 A	05-10-83	JP 58180500 A	21-10-83
FR 2529892 A	13-01-84	NONE	
WO 9316118 A	19-08-93	AT 152143 T	15-05-97
		AU 3493493 A	03-09-93
		CA 2129442 A	14-08-93
		DE 69310148 D	28-05-97
		DE 69310148 T	31-07-97
		EP 0625996 A	30-11-94
		ES 2101300 T	01-07-97
		JP 7503744 T	20-04-95
		US 5352756 A	04-10-94

THIS PAGE BLANK (USPTO)